

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類 C12N 15/09, 15/11, C12Q 1/02, 1/25, G01N 33/53, C07C 50/06, 50/30, 66/00, C07D 295/16, A61K 31/12, 31/165, 31/215	A1	(11) 国際公開番号 WO98/12313 (43) 国際公開日 1998年3月26日 (26.03.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/03303		
(22) 国際出願日 1997年9月18日 (18.09.97)		(81) 指定国 JP, US, 歐州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(30) 優先権データ 特願平8/250697 1996年9月20日 (20.09.96) JP		添付公開書類 国際調査報告書
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) サントリー株式会社(SUNTORY LIMITED)[JP/JP] 〒530 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号 Osaka, (JP)		
(72) 発明者 ; および (75) 発明者／出願人 (米国についてのみ) 布川陽一(NUNOKAWA, Youichi)[JP/JP] 〒560 大阪府豊中市刀根山3-6-1-403 Osaka, (JP) 及川信三(OIKAWA, Shinzo)[JP/JP] 〒615 京都府京都市西京区大原野東境谷町1-1-8-703 Kyoto, (JP) 田中正治(TANAKA, Shoji)[JP/JP] 〒659 兵庫県芦屋市湖見町4-9-1 Hyogo, (JP)		
(74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsuhi et al.) 〒300 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)		
(54)Title: METHOD FOR SCREENING COMPOUNDS REGULATING THE EXPRESSION OF HUMAN-INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE		
(54)発明の名称 ヒト誘導型一酸化窒素合成酵素の発現を制御する化合物のスクリーニング方法		
(57) Abstract A transformant prepared by constructing a plasmid wherein a human-inducible nitric oxide synthase (hiNOS) structural gene has been substituted by a luciferase structural gene which is a reporter gene while sustaining the functions of the 5'-promoter region and the 3'-untranslated region of the hiNOS gene and then stably transferring the plasmid into an established human cell line. This transformant expresses selectively the reporter gene in the presence of an inducer. By determining the expression dose of the reporter gene owing to this transformant, it is possible to conveniently and sensitively screen compounds seemingly being useful in treating inflammation or sepsis through the inhibition of the expression of hiNOS. By inducing the expression thereof, further, it is possible to conveniently and sensitively screen compounds seemingly being useful as antitumor agents or antiviral agents or in treating re-angiostenosis inhibition.		

(57) 要約

hiNOS遺伝子の5'-プロモーター領域および3'-非翻訳領域の機能を保持したまま、hiNOS構造遺伝子の代わりにレポーター遺伝子であるルシフェラーゼ構造遺伝子に置き換えたプラスミドを作製し、このプラスミドをヒト株化細胞に安定導入したものを作成した。該形質転換体は、誘導物質の存在下において、選択的にレポーター遺伝子を発現した。該形質転換体のレポーター遺伝子の発現量を調べることによって、hiNOSの発現を抑制することで炎症や敗血症治療に有用であると考えられる化合物を、またその発現を誘導することで抗腫瘍、抗ウイルス、血管再狭窄阻害治療に有用であると考えられる化合物を簡便、高感度にスクリーニングすることができるようになった。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード（参考情報）

AL アルバニア	ES スペイン	LK スリランカ	SE スウェーデン
AM アルメニア	FI フィンランド	LR リベリア	SG シンガポール
AT オーストリア	FR フランス	LS レソト	SI スロヴェニア
AU オーストラリア	GA ガボン	LT リトアニア	SK スロ伐キア共和国
AZ アゼルバイジャン	GB 英国	LU ルクセンブルグ	SL シエラレオネ
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE グルジア	LV ラトヴィア	SZ セネガル
BB ベルベドス	GH ガーナ	MC モナコ	TG スウェーデン
BE ベルギー	GM ガンビア	MD モルドバ共和国	TD チャード
BF ブルキナ・ファン	GN ギニア	MG マダガスカル	TJ トーゴ
BG ブルガリア	GW ギニアビサウ	MK マケドニア旧ユーゴス	TM トルクメニスタン
BJ ベナン	GR ギリシャ	LA ラヴィニア共和国	TR トルコ
BR ブラジル	HU ベンガリヤ	ML マリ	TT トリニダード・トバゴ
BY ベラルーシ	ID インドネシア	MN モンゴル	UA ウクライナ
CA カナダ	IE アイルランド	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CF 中央アフリカ共和国	IL イスラエル	MW マラウイ	US 米国
CG コンゴ	IS アイスランド	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CH スイス	IT イタリア	NE ニジエール	VN ベトナム
CI コート・ジボアール	JP 日本	NL オランダ	YU ユーコスラビア
CM カメルーン	KE ケニア	NO ノルウェー	ZW ジンバブエ
CN 中国	KG キルギスタン	NZ ニュージーランド	
CU キューバ	KP 朝鮮民主主義人民共和国	PL ポーランド	
CZ チェコ共和国	KR 大韓民国	PT ポルトガル	
DE ドイツ	KZ カザフスタン	RO ルーマニア	
DK デンマーク	LC セントルシア	RU ロシア連邦	
EE エストニア	LI リヒテンシュタイン	SD スーダン	

明細書

ヒト誘導型一酸化窒素合成酵素の発現を制御する化合物のスクリーニング方法

技術分野

本発明は、ヒト誘導型一酸化窒素合成酵素の発現量に影響を与える化合物、より具体的には該酵素の発現を制御する化合物のスクリーニング方法に関する。

背景技術

一酸化窒素（NO）は、血管弛緩因子として同定されたことを契機として、生体機能の調節に重要な働きを持つ生理活性物質であることが明らかとなってきた。それ以外にも血小板凝集の抑制作用、神経伝達物質の遊離作用、マクロファージの抗腫瘍、殺菌作用を有していることが報告されている (Moncada, S., and Higgs, A. (1993) N. Engl. J. Med. 329, 2002-2012)。

NOは、NO合成酵素（NOS）によってL-アルギニンを基質として生合成されるが、現在3種類のアイソザイム（脳型、血管内皮型、誘導型）の存在が確認されており、その染色体上の位置も明らかとなっている (Knowles, R. G., and Moncada, S. (1994) Biochem. J. 298, 249-258)。

そのうち、誘導型NOS（iNOS）は、マクロファージや血管平滑筋細胞（VSMC）、肝細胞、軟骨細胞、神経膠細胞などにエンドトキシンやサイトカインを作用させることにより、遺伝子転写が誘導されその発現が認められる。近年その遺伝子欠失（ノックアウト）マウスが作製され、感染防御が弱まる一方、炎症や敗血症の症状が野生型に比べ緩和されることが報告された (Wei, X., et al., (1995) Nature, 375, 408-411; MacMicking, J.D., et al., (1995) Cell, 81, 641-650)。iNOSは、種を越えて炎症状態によって誘導されることが報告されており、その酵素活性及び発現の抑制は症状緩和に効果があることが示されている (Moncada, S., and

Higgs, E. A. (1995) FASEB J. 9, 1319-1330)。また、敗血症モデルにおいてもiNOS酵素阻害剤の投与は効果が認められている (Kerwin, J. F., et al., (1995) J. Med. Chem. 38, 4343-4362)。

一方、内皮型NOS(eNOS)は恒常維持、特に血圧の上昇の抑制に関与していることが指摘されており、生体機能に重要な役割を担っていると考えられる。そこで、eNOSの活性には影響せず、iNOSを特異的に阻害する化合物が求められている。しかし、それらのアイソザイムの酵素活性を制御する蛋白質の一次構造上の領域が酷似しているため、NOS酵素阻害剤は特異性の点で十分なものは見いだされていないのが現状である。

一方、NOを放出する物質が、血管肥厚を抑制し、動脈硬化及び血管形成術後の血管再狭窄を抑制することが動物モデルで確認されている (Garg, U. C., and Hassid, A. J. (1989) J. Clin. Invest. 83, 1774-1777. Cooke, J. P., et al., (1992) J. Clin. Invest. 90, 1168-1172)。また、NOS遺伝子をVSMCにおいて強制発現すると、NOの産生増加とともに、VSMCの内膜肥厚が抑制されることも報告されている (von der Leyen, H. E., et al., (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 1137-1141)。このことから、NOを血管肥厚部位に発生させることによる血管肥厚に対する治療または予防効果が期待できる。

上記事実は、iNOSアイソザイム特異的な遺伝子発現調節化合物を見いだし、阻害薬は抗炎症剤として、また一方誘導薬は循環器領域において有用であることを示唆するものである。

ところで、ある遺伝子の発現を簡便かつ高感度に知る方法として、レポーター遺伝子が利用されている (横田崇、新井賢一、(1993)バイオマニュアルシリーズ4、羊上社)。レポーター遺伝子は、テストを行う遺伝子を直接検出する代わりに用いられるもので、現在、その発現産物量のアッセイが簡便である、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)、 β -ガラクトシダーゼ (β -Gal)、ルシフェラーゼなどが汎用されている。レポーター遺伝子の翻訳領域の上流

または下流に発現調節活性を調べたいDNAを挿入したプラスミドを作製し、その被験DNAの活性を高感度に検出することができる。

マウスのiNOS (*miNOS*) 遺伝子の発現調節を知る目的で、レポーター遺伝子を用いた実験結果が示されている。例えば、*miNOS*の転写開始部位上流域（以下「5'-フランкиング（flanking）領域」と称する）中、該転写開始部位から約1.7-kb上流にリボ多糖（LPS）やIFN- γ に反応して*miNOS*遺伝子の誘導に関与する領域があることが見い出され、さらに転写因子NF- κ BおよびIRF-1が結合すると考えられているコンセンサス配列部分が、誘導発現に必須であることが示されている（Xie, Q., et al., (1993) J. Exp. Med. 177, 1779-1784; Vodovotz, Y., et al., (1993) J. Exp. Med. 178, 605-613; Martin, E., et al., (1994) J. Exp. Med. 180, 977-984; Xie, Q., et al., (1994) J. Biol. Chem. 269, 4705-4708; 1995）。また、別の報告によれば、*miNOS*の転写開始部位約1.6-kb上流に該領域が見い出されている（Lowenstein, C. J., et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 9730-9734; Kamijo, R., et al., (1994) Science 263, 1612-1615）。しかし、いずれの報告も誘導を示す倍率は50倍以下であり、実際のiNOS誘導を高感度には示すことができないと考えられる。

一方、ヒトのiNOS (*hiNOS*) 遺伝子に関しては、そのcDNAの存在を示すことが困難であった。その理由の一つとして、マウスマクロファージやラットVSMCの場合と異なり、单一もしくは2種類のサイトカインなどで誘導が認められる細胞が発見されなかったことがあげられる。ヒトのマクロファージは、3種類以上のサイトカインで刺激しても*hiNOS*の誘導を認めることができないとの報告もある（Weinberg, J. B., et al., (1995) Blood 86, 1184-1195）。しかし、ヒト肝細胞を3種類以上のサイトカインなどで刺激することでその誘導を確認し、初めて*hiNOS*のcDNAをクローニングすることに成功したという報告（Geller, D. A., et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 3491-3495; 1995）の後、*hiNOS* cDNAのクローニングが多数報告されたが、誘導調節機構は明確になっていない（Sherman, P.

A., et al.,(1993) Biochemistry 32, 11600-11605. Charles, I. G., et al.,(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 11419-11423. Hokari, A., et al.,(1994) J. Biochem. 116, 575-58122.)。また、hiNOS構造遺伝子の全構造（図1）、及び該遺伝子の5'-フランキング領域約0.4-kbの配列が明らかにされた（Chartrain, N. A., et al.,(1994) J. Biol. Chem. 269, 6765-6772）。

一方、本発明者らは、ラット血管平滑筋からiNOS遺伝子をクローニングすることに成功し、そのcDNAは組織及び種を越えて一種類であることを示唆する報告を行った（Nunokawa, Y., et al.,(1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 191, 89-94）。更に、ヒトの遺伝子ライブラリーから、iNOS遺伝子のプロモーター領域を含むと推定される遺伝子を3.2-kb以上に渡ってクローニングし、5'-フランキング領域約1.5-kbの配列を明らかにし、該配列中に、miNOS遺伝子の配列と同様に、インターフェロン(IFN)- γ や転写因子NF-kBによって遺伝子発現が制御されると推定される転写因子のコンセンサス配列が見いだされることを報告した（Nunokawa, Y., et al.,(1994) Biochem. Biophys. Res. Commun. 200, 802-807）。

その後、5'-フランキング領域16-kbとレポーター遺伝子を用いた研究の結果、転写開始部位上流3.8-kb～16-kbにhiNOS誘導発現に必要な領域があることが報告された（de Vera, M. E., et al.,(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 1054-1059）。しかし、この報告でも誘導を示す倍率は約10倍程度であり、しかも非刺激時の発現が非常に強いことが示され、iNOSの強力な誘導を説明するには不十分であった。また、hiNOS遺伝子の転写開始部位からその上流約3.7-kbの領域は誘導発現に関与しないことが示された（Laubach, V. E., et al.,(1994) Abstract Book of the 1st International Conference of Biochemistry and Molecular Biology of Nitric Oxide (UCLA Sunset Village, Los Angeles, CA, USA), A1627.

Kleinert, H., et al.,(1996) Mol. Pharmacol. 49, 15-2128.）。

本発明者らは、クローニングを行なったhiNOS遺伝子の5'-フランキング領域約3.2-kbとレポーター遺伝子を連結したプラスミドを細胞に導入したが、miNOSプロ

モーター領域を用いて報告されている実験結果とは異なり、他グループのhiNOS遺伝子を用いた結果と同様に、5'-フランキング領域約3.2-kbを用いるだけでは非誘導条件下においてすでにレポーター遺伝子の発現が認められ、サイトカインによる誘導は認められないか、もしくは非常に弱いことを見いだした (Nunokawa, Y., et al., (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. 223, 347-352)。しかも種々のサイトカインによってhiNOSの誘導を確認できない細胞を用いても、このような構築を行ったプラスミドを導入するとレポーター遺伝子の発現が認められてしまうことがわかった (Nunokawa, Y., et al., (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. 223, 347-352)。すなわち、hiNOS遺伝子においては、miNOS遺伝子での報告結果を基に推察できるプロモーター領域だけでは、サイトカインなどの誘導因子による発現の制御を説明できないことが判明したが、その理由は全く明らかにされていないのが現状である。

発明の開示

本発明は、hiNOS遺伝子における、誘導因子による発現の制御に必要な領域を見いだし、該領域を含む発現ベクターを構築し、該発現ベクターを利用して、hiNOS遺伝子の発現を抑制または誘導する物質をスクリーニングする方法を提供することを課題とする。

前述のように、hiNOS遺伝子の転写開始点上流域、即ちhiNOS遺伝子の5'-フランキング領域をレポーター領域の上流に挿入すると、非誘導条件において本来認められることがないはずのレポーター遺伝子の発現が認められる。そのことから、本発明者らは、hiNOS遺伝子の発現が5'-フランキング領域以外で制御されている可能性があると推定し、実験を進めた。

hiNOS遺伝子3'-非翻訳領域(UTR)の配列(配列番号: 1)を調べると、hiNOS遺伝子の3'-UTRにはそのmRNAの不安定化に関与すると報告されている「AUUUA配列」が4ヶ所認められた(図2の下線部)。そこで、本発明者らはhiNOS遺伝子の発

現において、遺伝子の転写産物を不安定にする要素が誘導を支配している可能性があると考えた。

現在汎用されているレポーター遺伝子は、成熟mRNAを発現させる目的で、SV40由来のポリA付加を示す領域を加えて構築されているものが多い。従来、hNOS遺伝子の発現の確認に用いられたプラスミド、及び本発明者らが過去の報告に用いた「pGL3 basicプラスミド」も、SV40由来のポリA付加を示す領域（配列番号：2）をレポーター遺伝子の下流に加えて構築されている（図3）。そのため、テスト遺伝子の誘導が転写の活性化によるものだけでなく、產生されたmRNAの不安定さにも起因する場合には、レポーター遺伝子を含む発現ベクターに、產生されたmRNAの不安定さに寄与する部位を組み込む必要がある。

本発明者らは、本来認められるはずの高い誘導倍率は、プロモーターを含む5'-ランキング領域だけを用いたレポーター遺伝子の構築系を導入したのでは引き出せないと考え、レポーター遺伝子の下流にさらにhNOS遺伝子の3'-UTRと3'-ランキング領域を含む約1-kbの遺伝子断片を挿入した。その結果、その領域がプロモーター領域と協調して強い発現誘導に関与することを見いたした。即ち、該領域を挿入することで、非誘導条件下でのレポーター遺伝子の発現は消失し、サイトカインを作用させることではじめて活性が認められるようになることを見いたした。このことから、今まで知られていなかったサイトカインによるhNOSの誘導に必要な遺伝子の領域が明らかにされた。

また、本発明者らは、hNOS遺伝子のオープンリーディングフレーム領域（ORF）のみをレポーター遺伝子のORFに置き換えた遺伝子、即ち、レポーター遺伝子の上流にhNOS遺伝子のプロモーター領域を、下流にhNOS遺伝子の3'-UTRと3'-ランキング領域を含む約1-kbを挿入したプラスミドを作製し、該プラスミドを導入したヒト細胞株を用いて、hNOS遺伝子の発現を制御する化合物を高感度、迅速にスクリーニングする方法を開発し、本発明を完成した。

具体的には本発明は、本明細書特許請求の範囲に記載された各発明からなる。

本発明に用いられるhINOS遺伝子の5'-フランкиング領域、5'-UTR、3'-UTR及び3'-フランкиング領域を構成するDNAには、ヒト細胞から単離されたもののみならず、合成によって製造されたものも含まれる。また、これらのDNAに化学的修飾を加えたものや、これらのDNAの塩基に、置換、欠失、付加等の改変が加えられたDNAも、発現制御機能が維持される限り用いられる。なお、本発明に好適に用いられるhINOS遺伝子の3'-フランкиング領域を構成するDNAとしては、例えば、配列番号：16（図7の枠外の配列）に記載の塩基配列を有するものがあげられる。

本発明のレポーター遺伝子としては、その発現産物の活性又は生産量（mRNAの生産量も含まれる）を当業者が測定可能なものであれば、いかなるペプチド、タンパク質をコードする遺伝子も用いられる。例えば、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、 β -ガラクトシダーゼ（ β -Gal）、ルシフェラーゼなどが、酵素活性を測定することで利用できる。また、分泌型成長ホルモンなどは、免疫抗体反応法などでその生産量を測定することで利用できる。

また、本発明において、hINOS遺伝子の発現制御配列を含むベクターは、該発現制御配列を複製可能なベクター中に挿入することによって得ることができる。該複製可能なベクターとしては、例えば大腸菌内で複製可能なものとして、pUC18、pGEM-3Zなどがあげられる。

本発明において、hINOS遺伝子の発現量に影響を与える物質をスクリーニングする際には、本発明のhINOS遺伝子の発現制御配列を含むベクターで形質転換された細胞、又は天然の細胞であっても本発明で示された発現制御配列を有しhINOSの発現制御が行われ得る細胞を用いることができる。該細胞としては、哺乳動物細胞が好適に用いられる。形質転換は、通常の方法によって行うことができる。また、本発明に用いられる形質転換細胞としては、ベクターが定常的（パーマネント）に宿主染色体に組み込まれたものの他、ベクターが一時的（トランジエント）に宿主に導入されたものが用いられる。ベクターが定常的に宿主染色体に組み込

まれたものの選択は、導入したいベクター内に選択マーカー遺伝子を組み込んだベクター、または、導入したいベクターと同時に選択マーカーを含むベクター、で宿主細胞を形質転換し、該選択マーカーを有しているものだけが生存できる培地で該形質転換された細胞を培養することによって行うことができる。

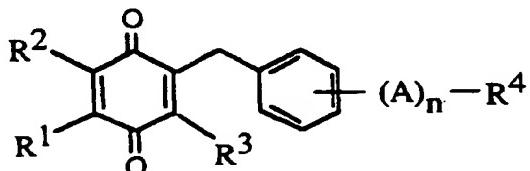
本発明における、*hiNOS*遺伝子の発現量に影響を与える物質のスクリーニングは、具体的には、例えば、一定時間培養した形質転換細胞に、被験物質の任意の量を添加し、一定時間後の該細胞が発現するレポーターの量を酵素活性として、または発現タンパク質の量として測定することによって行うことができる。スクリーニングの被験物質は、天然物でも合成物でもよい。また、単一物質でも、混合物でもよい。例えば、候補となる単一物質を独立して試験してもよく、いくつかの候補となる物質を混合したものについて試験をしてもよい。更に、コンビナトリアルライブラリーについて試験することも可能である。また、細胞抽出物のような混合物を分画したものについて試験を行い、分画を重ねて、最終的に、*hiNOS*遺伝子の発現量に影響を与える物質を単離することも可能である。

更に、本発明における、*hiNOS*遺伝子の発現量に影響を与える特定の物質の活性を変化させる物質のスクリーニングは、具体的には、例えば、一定時間培養した形質転換細胞に、候補物質の任意の量を添加し、一定時間後の該細胞におけるレポーター遺伝子の発現量の変化を、酵素活性の変化として、または発現タンパク質の量の変化として測定することによって行うことができる。スクリーニングの候補物質については、*hiNOS*遺伝子の発現量に影響を与える物質のスクリーニングと同様である。

本発明に係る*hiNOS*の発現を抑制する物質、または*hiNOS*遺伝子の発現を誘導する化合物の活性を抑制する化合物の効力については、哺乳動物に係る*iNOS*を発現しうる細胞又はその生体組織がNOを産生しうる条件下で、当該物質の添加又は投与によって培養液、血液、尿などに放出されるNOの産生量の低下の程度を調べることにより測定することができる。NOの生成量の測定自体は、実施例5の5)に

記載されているグリース法 (Green, L. C., et al., a(1982) *Anal. Biochem.* 126, 131-138) に代表される公知の方法により行うことができる。

上記のような、本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物は、*h*NOS遺伝子の発現量に影響を与える化合物、例えば、*h*NOS遺伝子の発現を抑制する化合物、または*h*NOS遺伝子の発現量に影響を与える特定の化合物の活性を変化させる化合物、例えば、*h*NOS遺伝子の発現を誘導する化合物の活性を抑制する化合物である。*h*NOS遺伝子の発現を誘導する化合物の活性を抑制する化合物の具体例としては、以下の一般構造式で表される化合物が挙げられ、



[式中R¹、R²およびR³はそれぞれ独立に水素原子、メチル基又はメトキシ基を表し、Aはエチレン基又はビニレン基を表し、nは0又は1を表し、R⁴は水素原子、ヒドロキシメチル基、エステル化又はアミド化されていてもよいカルボキシル基を表す。]

また、より具体的な例としては、本明細書の実施例7において得られた、図17に示す化学構造式で表される化合物 (3- [4- (3,4-ジメトキシ-6-メチル-2,5-ベンゾキノニルメチル) フェニル] -1-チオモルホリノ-1-オキソプロパン) をはじめ、3- [3- (2,5-ベンゾキノニルメチル) フェニル] アクリル酸エチルエステル、3- (2,5-ベンゾキノニルメチル) ベンジルアルコール、3- (2,5-ベンゾキノニルメチル) 安息香酸、3- [3- (2,5-ベンゾキノニルメチル) フェニル] プロピオン酸、3- [3- (2,5-ベンゾキノニルメチル) フェニル] プロピルアルコール、3- [3- (2,5-ベンゾキノニルメチル) フェニル] アクリル酸、3- [4- (3,4-ジメトキシ-6-メチル-2,5-ベンゾキノニルメチル) フェニル] プロピオン酸、2,3-ジメトキ

シ-5-ベンジル-6-メチル-1,4-ベンゾキノン、3-[4-(3,4-ジメトキシ-6-メチル-2,5-ベンゾキノニルメチル)フェニル]プロパノール、及び3-[3-(3,4-ジメトキシ-6-メチル-2,5-ベンゾキノニルメチル)フェニル]プロピオン酸エチルエステル等が挙げられる。

本発明に係る化合物は、直接的または間接的にhNOS遺伝子の発現を抑制することができるため、hNOSの発現の異常に関わる病理学的状況または疾患、好ましくはhNOS遺伝子の発現過剰を伴う病理学的状況または疾患を治療するための医薬組成物として有用である。例えば、心臓及び脳血管障害、虚血性心疾患、敗血症ショック、疼痛、リウマチ、関節炎、喘息、免疫不全、ウイルス性もしくは非ウイルス性の感染症、自己免疫疾患、痴呆、および癌 (Cattell, V. and Jensen, A., *Histochem. J.*, Vol.27, p777-784, 1995; Ogden, J. E., and Moore, P. K., *TIBTECH* Vol.13, p70-78, 1995)などに対する治療薬として有用である。

本発明の化合物を医薬組成物として使用する場合、例えば、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などの剤形で経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物と、生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、安定剤、などを、一般に認められた形態で混和することによって製造することができる。錠剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチンのような結合剤、コーンスタークのような膨化剤、結晶性セルロースのような賦形剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤などを用いることができる。カプセルの剤形である場合には、前記の組成物にさらに液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物も、通常の処方を適用することができる。

注射用の水性液としてはブドウ糖などを含む等張液などがあげられ、ポリエチレングリコールのような適当な溶解補助剤などと併用してもよい。また、緩衝剤、安定剤、保存剤、酸化防止剤、無痛化剤、などと配合してもよい。このように

して得られる製剤は、例えばヒトをはじめとする哺乳動物に対して投与することができる。投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人においては、一日につき約0.01～100mg、好ましくは約0.1～50mg、より好ましくは約1.0～25mgである。非経口的に投与する場合は、たとえば注射剤の形では通常成人においては、一日につき約0.001～50mg程度、好ましくは約0.01～25mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好ましい。

図面の簡単な説明

図1は、hiNOS構造遺伝子の全構造を示す図である。

図2は、hiNOS遺伝子第26エキソンに存在する、3'-非翻訳領域(UTR)の塩基配列を示す図である。左端の数字は翻訳領域開始の塩基を1としたときの番号を表す。ATTTA配列は下線を施し、想定されるポリA付加部位は↑で示した。太字はhiNOS翻訳領域における翻訳停止配列を示す。また、用いたプライマーの基となる塩基配列を記号と共に矢印で示した。

図3は、pGL3 basicプラスミドの構造と、SV40由来のポリA付加を示す領域の塩基配列を示す図である。ポリA付加に関する「PolyAシグナル」と「G/Tクラスター」には下線を施した。

図4は、プラスミドの構築に用いたプライマーの塩基配列を示す図である。

図5は、hiNOS遺伝子の5'-フランキング領域のDNAを含む精製ファージゲノムの制限酵素分解断片(EcoRI、HindIII、XbaIで消化)のサザンプロットを示す写真である。

図6は、hiNOS遺伝子の5'-フランキング領域のDNAにNcoI認識部位を導入するために用いた塩基配列置換を示す図である。太字で示した塩基TをCAに置換し、変異体プラスミドを構築した。

図7は、hiNOS遺伝子の3'-非翻訳領域(UTR)と5'-フランキング領域の塩基配列を示す図である。左端の数字は翻訳領域開始の塩基を1としたときの番号を表

す。枠内はエキソン26の3'-UTRを示す。3'-フランギング領域内のポリA付加のためのコンセンサス配列(YGTGTTYY)を下線で示した。太字はhINOS翻訳領域における翻訳停止配列を示す。また、用いたプライマーの基となる塩基配列を記号と共に矢印で示した。

図8は、hINOS遺伝子の非構造領域を含む発現ベクターの構造を示す図である。

図9は、発現ベクターが一過性導入されたA549細胞のサイトカイン刺激に対する反応を示す図である。

図10は、A549細胞をサイトカイン刺激したときの核抽出物のゲルシフトアッセイを示す写真である。

図11は、hINOSLucが安定に導入されたA549細胞のサイトカイン刺激に対する反応を示す図である。

図12は、グリース発色法による、A549細胞のサイトカイン刺激に対する反応を示す図である。

図13は、LPS、IL-6、cAMP、TPAの、hINOSLucが安定に導入されたA549細胞のサイトカイン刺激に対する反応に与える影響を示す図である。

図14は、蛋白質燐酸化酵素阻害剤スタウロスポリンの、サイトカインによるhINOS遺伝子の発現誘導に与える影響を示す図である。

図15は、デキサメサゾンの、サイトカインによるhINOS遺伝子の発現誘導に与える影響を示す図である。

図16は、蛋白質分解酵素阻害剤TLCKの、サイトカインによるhINOS遺伝子の発現誘導に与える影響を示す図である。

図17は、本発明のスクリーニング系を用いて見いだされた化合物Iの構造式を示す図である。

図18は、化合物Iが、本発明のスクリーニング系に与える影響を示す図である。

図19は、化合物Iが、hINOSの発現をmRNAレベルで抑制していることを示す写

真である。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例を示して本発明をより具体的に説明するが、本発明の内容は、以下の実施例に制限されるものではない。

[実施例 1] 発現ベクターの構築

1) hiNOS 5'-フランкиング領域のクローニング

2.5x10⁶個からなるヒトゲノムライブラリー（クロントック社、アメリカ、EMBL3ベクターに組み込まれたファージライブラリー）から、ブラークハイブリダイゼーションによって、hiNOS 5'-フランкиング領域DNAを含むクローンのスクリーニングを行うためのプローブを作製した。

プローブは、本発明者らが既に単離したラット由来iNOS cDNA(VSM-NOS) (Nuno kawa, Y., et al., (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 191, 89-94) を鑄型にし、SU802プライマー（ラットVSM-NOS cDNAの-138番～-117番に相当／配列番号：3、図4）およびMI103プライマー（同168番～188番に相当／配列番号：4、図4）を用いて、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって増幅したcDNAを用いた。PCRは、Taqポリメラーゼ（宝酒造社）とその添付緩衝液を用いて行なった。このcDNAは、hiNOS構造遺伝子の5'末端の塩基配列と相同意が高いことが明らかである。ブラークハイブリダイゼーションは、ECLダイレクトDNAラベリング検出システム（アマシャム社、英国）を用いて添付の実験手順書に従って行なった。

陽性ブラークをキアゲンラムダキット（キアゲン社、ドイツ）を用いて精製した後、EcoRIで消化し、このプローブを用いたサザンプロット解析によって約5-kbのDNAがハイブリダイズすることを確認した（図5）。

EcoRIで消化された約5-kbのDNAをpUC118プラスミド（宝酒造社）のEcoRI部位にサブクローニングした後、NcoI認識部位作製のため、図6（配列番号：13）で示したように塩基配列を置換した変異体プラスミドを作製した。作製はクロント

ック社のサイトダイレクテッド・ミュータジェネシスキットを用いて添付の実験手順書に従った。作成後、*Kpn*I および *Nco*I で消化しそのDNA断片を下記 3) の実験で用いた。

2) *hiNOS* 3'-UTR 及び該領域を含む下流約1-kbの遺伝子断片のクローニング

1) で用いたヒトゲノムライブラリーを60のサブプール（1プールあたり約4万クローン）に分け、*hiNOS* cDNA 3'-UTR（図1のエキソン26の3'側、図7の枠内）の配列を基に2種のフォワード（SA101／配列番号：5、SA102／配列番号：7）およびリバースプライマー（KI101／配列番号：6、KI102／配列番号：8）を作成し（図4）、PCRによって3'-UTRを含むプールを同定した。さらにその陽性プールを30のサブプールに分け、同様のPCRをおこなって陽性クローンが含まれるプールを同定した。この時点で、プールの中には計算上約1000以上のクローンが含まれていると思われたが、同定したサブプールの全クローンを含むファージを培養し、キアゲンラムダキット（キアゲン社）を用いてファージDNAを精製した後、SA101とKI101を用いるPCRによってDNAの増幅が認められたことから、*hiNOS*の3'-UTRが含まれていることを確認した。PCRの確認は、1)と同じ方法で行なった。

次に、精製DNAを鋳型にしてフォワードプライマー（SA101）とファージベクター上のEMBL3右アームSP6プロモーター部分の塩基配列を基に作成したリバースプライマー（KI103／配列番号：9、図4）を用いてPCRによって3'-UTRを含むその下流部分のDNAを増幅した。増幅されたDNAの塩基配列をダイデオキシタミネーターキット（アプライドバイオシステムズ社、アメリカ）を用いて、アプライドバイオシステムズ社A373蛍光シークエンサーによる直接塩基配列決定法によって決定した。結果を、配列番号：14および図7に示す。

増幅されたDNAは、*hiNOS* 3'-UTRを含む領域であることが確認されたので、その情報を基にポリア付加部位を決定し、3'-UTRの末端を含むリバースプライマーを作製した（KI104／配列番号：11、図4）。また、3'-フランкиング領域の塩基配列を基にKI105リバースプライマー（配列番号：12）を作製した（図4、図7）

。精製DNAを錠型にしてSA103（配列番号：10）とKI104を用いたPCRによって、3'-UTR約0.5-kbのDNAを増幅した。SA103は5'末端にNheI認識部位を、KI104は5'末端にSalI認識部位を導入してあるので、SalIおよびNheIで消化しそのDNA断片（3'-UTR）を下記3)の実験で用いた。

精製DNAを錠型にしてSA103とKI105とを用いたPCRによって、3'-UTRおよび3'-フランキング領域を含む約1-kbのDNAを増幅した。SA103は、5'末端にNheI認識部位を、KI105は5'末端にBamHI認識部位を導入してあるので、BamHIおよびNheIで消化しそのDNA断片（3'-UTR及び3'-フランキング領域を含む）を下記3)の実験で用いた。

3) hINOS遺伝子の非構造領域を含む発現ベクターの構築

(3-A) 5'-フランキング領域及び5'-UTRをpGL3 basicプラスミドのルシフェラーゼ遺伝子の上流に挿入したプラスミド（pGLNOS5+SV3）の構築

pGL3 basicプラスミド（プロメガ社、アメリカ）を制限酵素KpnIおよびNcoIで消化し、前記1)で作製したDNA断片を挿入した（図8A）。

(3-B) pGL3 basicプラスミドに含まれるルシフェラーゼ遺伝子の終止コドン直下からSV40由来ポリA付加シグナルの領域までを除去し、その代わりhINOS遺伝子の3'-UTRと3'-フランキング領域を含む約1-kbの断片をpGL3 basic中のルシフェラーゼ遺伝子の直下に挿入したプラスミド（pGLNOS3A）の構築

pGL3 basicプラスミドをBamHI及びXbaIで消化し、2)で作製したDNA断片（3'-フランキング領域）を挿入した（図8B）。

(3-C) pGL3 basicルシフェラーゼ遺伝子の上流にhINOS遺伝子の5'-フランキング領域及び5'-UTRを、ルシフェラーゼ遺伝子の終止コドン直下からSV40由来ポリA付加シグナルの領域までを除去し、その代わりにhINOS遺伝子の3'-UTR及び3'-フランキング領域を含む約1-kbの断片を挿入したプラスミド（pGLNOS53A）の構築

pGL3 basicプラスミドをBamHIおよびXbaIで消化し、前記2)で作製したDNA断片（3'-UTR及び3'-フランキング領域を含む）を挿入した。該プラスミドを制限酵

素KpnIおよびNarIで消化し、前記1)で作製したDNA断片を挿入した(図8C)。

(3-D) (3-A)のpGLNOS5+SV3プラスミドに含まれるルシフェラーゼ遺伝子の終止コドン直下からSV40由来ポリA付加シグナルの領域までを除き、その代わりにhiNOS遺伝子の3'-UTRをルシフェラーゼ遺伝子の下流に挿入したプラスミド(pGLNOS53-SV3)の構築

pGL3 basicプラスミドを制限酵素XbaI及びSalIで消化し、DNA断片(3'-UTR)を挿入した後、KpnIおよびNarIで消化した。そのプラスミドにpGLNOS5+SV3をKpnI及びNarIで消化したDNA断片を挿入した(図8D)。

(3-E) hiNOS遺伝子の3'-UTRを(3-A)のpGLNOS5+SV3プラスミドのルシフェラーゼ遺伝子の直下に挿入したプラスミド(pGLNOS53+SV3)の構築

(3-Dの)pGLNOS53-SV3プラスミドを制限酵素SalIで消化し、DNA平滑末端キット(宝酒造)を用いて平滑末端にした後、NarIで消化した。そのプラスミドにpGLNOS5+SV3プラスミドをXbaIで消化し、DNA断片をDNA平滑末端キットを用いて平滑末端にした後、NarIで消化したDNAを挿入した(図8E)。

[実施例2] 発現ベクターが一過性導入されたA549細胞のサイトカイン刺激に対する反応

サイトカイン刺激によってhiNOSを発現することが知られているヒト肺癌由来株細胞A549をATCCから入手し(カタログ番号「CCL185」)、5% CO₂インキュベーター内でGIT培地(和光純薬)で培養した。図8に示された発現ベクターをそれぞれA549細胞にリポフェクトアミン(ライフテックオリエンタル社、アメリカ)を用いて一過性に導入し、ヒトIL-1 β (1ng/ml)またはヒトIL-1 β (1ng/ml)+ヒトIFN- γ (1000U/ml)+ヒトTNF- α (500ng/ml)(この混合物を以下「CM」と称することがある)を添加した6時間後の反応を調べた(図9)。ルシフェラーゼ活性測定は、ルシフェラーゼアッセイシステム(プロメガ社)のプロトコールに従つて行った。検出には、アルガス-50-ルミノメーター(浜松ホトニクス社)を用いた。ヒトIL-1 β は、ジェンザイム社(アメリカ)より購入した。ヒトIFN- γ およ

びヒトTNF- α は、サントリー生物医学研究所で通常の方法により製造したものを使用した。この実験の場合、アッセイの標準化を行なうため、対照ベクターとして β -gal発現ベクター（pSV- β -gal、プロメガ社）を同時に導入し、結果を補正した。

pGLNOS5+SV3を導入した場合、非刺激時の高い発現が認められ、サイトカインによる強い誘導は認められなかった。またpGLNOS53+SV3を導入した場合も、pGLNOS5+SV3を導入した場合と同様であった。更にpGLNOS53-SV3プラスミドを用いた場合、非刺激時の発現だけでなくサイトカインによる刺激によっても発現の誘導はみられなかった。一方、pGLNOS53A (hNOS遺伝子の3'-UTR及び3'-フランкиング領域を含むプラスミド) を用いた場合、非刺激時にはルシフェラーゼの発現が殆ど認められず、IL-1 β の添加ではじめて高い発現を認められるようになり、さらに3種のサイトカインの添加によって非常に強い発現を示すようになった。すなわち、hNOS遺伝子は、3'-UTR及び3'-フランкиング領域の両者が存在して、発現制御が行なわれることが判明した。

[実施例3] hNOS発現誘導に関与すると考えられる遺伝子配列

ゲルシフト法によって、hNOS遺伝子の転写開始点の上流131塩基～97塩基(-131～-97)に相当する2本鎖DNA (5'-AACTGTACACAAGCTGGGGACACTCCCTTGGAAA-3' / 配列番号: 15)に対する蛋白質の結合を、サイトカイン刺激によって認めることができる。本DNA配列には、NF- κ Bが結合することが予想されるコンセンサス配列が含まれている。ゲルシフト法は、前記2本鎖DNAをディゴキシゲニン(DIG)化し(ゲルシフトアッセイキットを使用、ペーリンガーマンハイム社、ドイツ)、A549細胞から抽出した核画分とインキュベートし、7.5%ポリアクリルアミドゲル(バイオラッド社、アメリカ)を用いて4°Cで電気泳動することによって行なった。また、細胞の核画分は、IL-1 β (1ng/ml)またはCMで4時間刺激した細胞、および無刺激の細胞をシュライバーらの方法(Schreiber, E., et al., (1989) Nucleic Acids Res. 17, 641930)で抽出した。電気泳動の終わったゲル中

のDNAを電気転写法（アト一社の装置を使用）を用いてゼータープローブナイロン膜（バイオラッド社）に移し替え、化学発光するDIG認識抗体でDIG化されたDNAを検出した。

図10にその結果を示した。本配列には、非刺激時においても、A549核画分中に存在する蛋白質(A)が結合するが(図10のバンドAに対応)、IL-1 β やCM刺激によって、A549核画分中に存在する別の結合蛋白質(B)が結合するようになることが判明した(図10のバンドBに対応)。このことから、本発明に用いるhiNOS遺伝子の5'-フランкиング領域にもmiNOSと同様に、サイトカインなどの刺激によってNF- κ Bが結合する領域があることが明らかになった。

[実施例4] 発現ベクターが安定導入されたA549細胞(A549/hiNOSLuc)の作製とサイトカイン刺激に対する反応

A549細胞にリポフェクトアミン(ライフテックオリエンタル社、アメリカ)を用いて、pGLNOS53AとpSV2neo(クロンテック社)を同時にトランスフェクションし、G418硫酸塩(1mg/ml、ライフテックオリエンタル社)を培地に添加することでpGLNOS53Aが安定導入された細胞(A549/hiNOSLuc)を選択した。

G418耐性となった複数個の細胞株より任意に6クローンを選び出し、IL-1 β (1ng/ml)およびCMを添加し、24時間後の反応を無刺激の場合と比較した。その結果、6クローンの全てが、サイトカイン刺激の場合のみルシフェラーゼの発現を認められる結果となった。このことから、発現の誘導には、導入されるプラスミドの構造が重要であり、遺伝子の導入された染色体上の位置は影響を与えないことが判明した。

[実施例5] A549/hiNOSLucのサイトカイン刺激に対する反応と、hiNOS発現のパターンとの比較

実施例4で取得したG418耐性細胞から1クローン(A5)を選択し、以下に列挙する種々の物質によるルシフェラーゼ発現の誘導を調べた。(A5を選択した根拠は存在しない。) 実験は、96穴プレートに1ウェル当たり約1万個/100 μ lとなる

ようにA5細胞を播き、24時間培養した後、以下の物質を添加し、6時間または24時間後の細胞内のルシフェラーゼ活性を、ルシフェラーゼアッセイシステム（プロメガ社）のプロトコールに従って測定した。検出には、アルガス-50-ルミノメーター（浜松ホトニクス社）を用いた。

1) IL-1 β

IL-1 β (1ng/ml) の刺激によって、少なくとも 6 時間以内にルシフェラーゼの発現が認められた。しかし、同用量のIL-1 β 単独では24時間後でも 6 時間作用させた場合と発現量に変化はなかった（図11）。

2) IFN- γ

IFN- γ (1000U/ml) の刺激では発現誘導は認められなかった（図11）。

3) TNF- α

TNF- α (500ng/ml) の刺激では発現誘導は認められなかった（図11）。

4) サイトカインの組み合わせ

1)～3)で実施した3種類のサイトカインを同時添加(CM)すると、6時間以内では発現誘導は弱いが、24時間後では非常に強い発現を認めることができる（図11）。そのレベルはバックグラウンド値（約100～200カウント）の約500倍以上の発現をしているものと考えられ、CMによってhNOSが強力に誘導される報告と合致する。その他、IL-1 β (1ng/ml) +IFN- γ (1000U/ml) の添加によっても強い発現誘導が認められ、両者の共存下で24時間培養すると、IL-1 β (1ng/ml) の刺激よりも著しい発現誘導が認められた（図11）。また、IL-1 β 非存在下であってもIFN- γ とTNF- α の刺激によって24時間後に誘導が認められた。

5) グリース発色法を用いた場合との比較

細胞が実際に、NOを産生していることを間接的に知る方法として、ジアゾ化反応を利用したグリース法が知られている（Green, L. C., et al., a(1982) Anal. Biochem. 126, 131-138）。グリース法は、ナフチルエチレンジアミン（関東化学、東京）とスルファニル酸（ナカライトスク）を混合したグリース試薬と培養液

中のNO₂⁻イオンを反応させてその発色をマルチタイターブレートリーダー（モレキュラーデバイス社）による540nmの吸収で測定する。この方法によって、サイトカイン刺激48時間後のA549細胞培養液中に蓄積されたNO量を測定した結果、IL-1 β (1ng/ml) やCMでNOの産生が認められた（図12）。

これらの結果は、1)～4)のルシフェラーゼの発現によるアッセイ結果と整合性があり、ルシフェラーゼの発現を検出することによって、簡便にhiNOS由来のNO産生量を算定することが可能であることが確認された。（ルシフェラーゼの発現による方法の感度は、グリース法よりも100倍以上敏感であった。）

[実施例6] iNOSの発現に影響を及ぼすと考えられる化合物の、本発明のアッセイ系に対する影響

1) LPS (lipopolysaccharide; リポ多糖)、IL-6、cAMP、TPA (tetradecanoyl phorbol acetate; ホルボールエステル)、および蛋白質燐酸化酵素阻害剤の影響

LPS (シグマ社、アメリカ)、IL-6 (ジェンザイム社)、cAMP (ジブチリル体を使用、シグマ社) 及びTPA (ナカライトスク社) は、マウスおよびラットの細胞を使用した系において、iNOSを誘導することが報告されている。これらの化合物の存在下で、実施例5と同様なルシフェラーゼの発現量の測定を行った。その結果、これらの物質は、コントロールレベルのみならず、サイトカインによる活性化に対してもほとんど影響を与えなかった（図13）。このことから、実施例5記載のアッセイ系はこれら物質による影響を受けにくいことがわかった。なお、蛋白質燐酸化酵素阻害剤スタウロスボリン（和光純薬社）は、1μM以下の濃度で、IL-1 β (1ng/ml) およびCM刺激による発現の活性化を抑制することが判明した（図14）。

2) 糖質ステロイドの影響

デキサメサゾン (Dex) (和光純薬) は強力な抗炎症作用を有しており、その作用メカニズムの一つは、転写因子NF-κBの活性化の抑制であることが知られている (Ray, A., and Prefontaine, K. E. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91,

752-756)。また、iNOSの発現も抑制することが報告されている (Radomski, M. W., et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 10043-10047)。デキサメサゾン存在下で、実施例5と同様なルシフェラーゼの発現量の測定を行ったところ、 $10\mu M$ 以下の濃度で、IL-1 β (1ng/ml) またはCMによる発現の誘導が抑制された (図15)。また、その抑制効果はサイトカイン刺激1時間後に添加した場合に消失した。

3) 蛋白質分解酵素阻害剤の影響

蛋白質分解酵素はI-kB (NF-kBの活性化を細胞質内で抑制しているタンパク質/Verma, I. M. et al., (1995) Genes & Dev., 9, 2723-2735を参照) の分解を介して、NF-kBの活性化に関与すると考えられている。蛋白質分解酵素阻害剤の一つであるTLCK (ナカライトスク) はNF-kBの活性化を阻害すると共に、iNOSの誘導を阻害することが知られている (Griscavage, J. M., et al., (1995) Biochem. Biophys. Res. Commun. 215, 721-729)。TLCK存在下において、実施例5と同様なルシフェラーゼの発現量の測定を行ったところ、TLCKは、IL-1 β (1ng/ml) またはCMによる発現の誘導を約 $10\mu M$ で抑制することが示された (図16)。

これらの実験結果からも、hiNOSの発現制御に関与する化合物を、実施例5に記載されたような系を用いて見出すことができる事が示された。

[実施例7] hiNOS遺伝子の発現に影響を与える化合物のスクリーニング

実施例5と同様に、96穴プレートに1ウェル当たり約1万個/ $100\mu l$ となるよう A5細胞を入れ、24時間培養した。その後、hiNOS遺伝子の発現に影響を与えるか否か未知である特定の化合物または複数の特定の化合物の混合物を添加し、更に1時間培養した。その後、IL-1bおよびTNF-aを添加し、実施例6と同様な方法で、IL-1bおよびTNF-a添加24時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。多数の化合物または化合物の混合物をスクリーニングした結果、図17に示す化合物Iが濃度依存的にルシフェラーゼ活性を抑制することが明らかとなった (図18)。

また、更に、このスクリーニングによって、hiNOS遺伝子の発現を抑制する作用

が確認された化合物I ($20\mu\text{g/ml}$) が、野生型のA549細胞をCMで刺激した場合のh iNOS mRNAの発現を抑制していることを確かめた(図19)。一方同濃度の化合物Iは、野生型のA549細胞において構成的に発現している β -アクチンのmRNAの発現には影響を与えたなかった(図19)。

なお、hiNOS遺伝子の発現を誘導する化合物のスクリーニングは、本実施例7と同様の方法、例えば、A5細胞に被験化合物を添加し、ルシフェラーゼ活性が上昇する化合物を選択するなどの方法により行うことができる。

このように、本発明のスクリーニング系を用いて、hiNOS遺伝子の発現に影響を与える化合物を見いだすことが可能であることが示された。

産業上の利用の可能性

本発明によって、ヒト誘導型一酸化窒素(NO)合成酵素(hiNOS)の発現を制御する化合物を、簡便かつ高感度にスクリーニングする方法が提供された。本発明の方法によって、hiNOSの発現を抑制することで炎症や敗血症治療に有用であると考えられる化合物を、またその発現を誘導することで抗腫瘍、抗ウイルス、血管再狭窄阻害治療に有用であると考えられる化合物を簡便、高感度にスクリーニングすることができるようになった。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 604

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列

AGCCAGAACG GCTATCACGA AGATATCTTC GGTGCTGTAT TTCCCTTACGA GGCGAAGAAG	60
GACAGGGTGG CGGTGCAGCC CAGCAGCCTG GAGATGTCAG CGCTCTGAGG GCCTACAGGA	120
GGGGTTAAAG CTGCCGGCAC AGAAACTTAAG GATGGAGCCA GCTCTGCATT ATCTGAGGTC	180
ACAGGGCCTG GGGAGATGGA GGAAAGTGAT ATCCCCCAGC CTCAAGTCTT ATTCCTCAA	240
CGTTGCTCCC CATCAAGCCC TTTACTTGAC CTCCCTAACAA GTAGCACCCCT GGATTGATCG	300
GAGCCTCCTC TCTCAAAC TG GGGCCTCCCT GGTCCCTTGG AGACAAAATC TTAAATGCCA	360
GGCCTGGCGA GTGGGTGAAA GATGGAACCTT GCTGCTGAGT GCACCACTTC AAGTGACCAC	420
CAGGAGGTGC TATCGCACCA CTGTGTATTT AACTGCCTTG TGTACAGTTA TTTATGCCTC	480
TGTATTTAAA AAACTAACAC CCAGTCTGTT CCCCATGGCC ACTTGGGTCT TCCCTGTATG	540
ATTCCTTGAT GGAGATATTT ACATGAATTG CATTTCACCTT TAATCACAAA AAAAAAAA	600
AAAA	604

配列番号 : 2

配列の長さ : 296

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列

CTAGAGTCGG GGC GGCGCCGGC CGCTTCGAGC AGACATGATA AGATACATTG ATGAGTTTGG	60
ACAAACCACA ACTAGAATGC AGTGAAAAAA ATGCTTTATT TGTGAAATT GTGATGCTAT	120
TGCTTTATT GTAACCAATT TAAGCTGCAA TAAACAAGTT AACAAACAACA ATTGCATTCA	180
TTTATGTTT CAGGTTCAAGG GGGAGGTGTG GGAGGTTTT TAAAGCAAGT AAAACCTCTA	240
CAAATGTGGT AAAATCGATA AGGATCCGTC GACCGATGCC CTTGAGAGCC TTCAAC	296

配列番号 : 3

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列

CTTCTCAGCC ACCTTGGTGA GG	22
--------------------------	----

配列番号 : 4

配列の長さ : 21

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列

TTCTGTGCAG TCCCAGTGAG G	21
-------------------------	----

配列番号 : 5

配列の長さ : 19

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列

AGCCAGAAC GCTATCACG

19

配列番号 : 6

配列の長さ : 27

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列

TGTGATTAAA GTAAAATGCA ATTCAATG

27

配列番号 : 7

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列

GCCTGGAGAT GTCAGCGCTC TG

22

配列番号 : 8

配列の長さ : 21

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列

GGGGAACAGA CTGGGTGTTA G

21

配列番号 : 9

配列の長さ : 19

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列

CATTTAGGTG ACACATATAG

19

配列番号 : 10

配列の長さ : 29

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列

GGCGCTAGCC TACAGGAGGG GTTAAAGCT

29

配列番号 : 11

配列の長さ : 39

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列

GCGGCCGCGT CGACGATTAA AGTAAAATGC AATTCAATGT

39

配列番号 : 12

配列の長さ : 26

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列

GCGCGGATCC GGCCCCACTCT CCTAAG

26

配列番号 : 13

配列の長さ : 27

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 (合成DNA)

配列

ATGGCCTGTC CCATGGAAAT TTCTGTT

27

配列番号 : 14

配列の長さ : 1026

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列

TGAGGGCCTA CAGGAGGGGT TAAAGCTGCC GGCACAGAAC TTAAGGATGG AGCCAGCTCT	60
GCATTATCTG AGGTACACAGG GCCTGGGGAG ATGGAGGAAA GTGATATCCC CCAGCCTCAA	120
GTCTTATTTC CTCAACGTTG CTCCCCATCA AGCCCTTAC TTGACCTCCT AACAAAGTAGC	180
ACCCTGGATT GATCGGAGCC TCCTCTCTCA AACTGGGGCC TCCCTGGTCC CTTGGAGACA	240
AAATCTTAAA TGCCAGGCCT GGCGAGTGGG TGAAAGATGG AACTTGCTGC TGAGTGCACC	300
ACTTCAAGTG ACCACCAAGGA GGTGCTATCG CACCACTGTG TATTTAACTG CCTTGTGTAC	360
AGTTATTTAT GCCTCTGTAT TTAAAAAAACT AACACCCAGT CTGTTCCCCA TGGCCACTTG	420
GGTCTTCCCT GTATGATTCC TTGATGGAGA TATTTACATG AATTGCATT TACTTTAAC	480
ACACTGTATG CGTGTGTGGG TGTTTGTAG GGAAAGCTCT TCTCAGAGTG GGGAGCTGGT	540
GGGTGTACACA GCCTGGACAG ATCCCCGACA GAGGGACACC CCAGCCAGTC CATGGCTCCT	600
CTGAAATGGC TGCCAGGTGT GCCAGCAGCA GATGGAGCTT CGTGCTGGTC CAAAGACCTG	660
TGGTAGGGCA GGGGGCGCAG GCCTGCCTCC CACACAAAGT ATCTGAAACG GGGTCTGGTG	720
AGGGTGGGAT TGTGCATAA GGCCAGTGT TCGAGGAAGG CCTTGAGCTT CTTCTTGGAC	780
ACTGTCTTAG AAAGCGTTT GCTCTGGGGC CACCAAGTCTC ATGCGAGACT GTGTGCCTTG	840
GCCAGTACGG ATGTGGTCCC TGGGAAGGCA GCGTGTGAG GCGAGTGTGG GCCACAACAT	900
CCTCGCCTGA GGGACTGGGG ACCCTCTTGG GTTTGGAGCA GGCCAAGGAA TCCTTCTTAG	960
GAGAGTGGGC CCCGTTTCCCT TCTCCTGGTC AGAACCCAAA AAGGAGCTCA GCGGCAGGCA	1020

CTGGGG

1026

配列番号 : 15

配列の長さ : 25

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列

AACTGTACAC AAGCTGGGGA CACTCCCTTT GGAAA

25

配列番号 : 16

配列の長さ : 544

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列

ACTGTATGCG TGTGTGGGTG TTTTGTAGGG AAAGCTCTTC TCAGAGTGGG GAGCTGGTGG	60
GTGTCACAGC CTGGACAGAT CCCCGACAGA GGGACACCCC AGCCAGTCCA TGGCTCCTCT	120
GAAATGGCTG CCAGGTGTGC CAGCAGCAGA TGGAGCTTCG TGCTGGTCCA AAGACCTGTG	180
GTAGGGCAGG GGGCGCAGGC CTGCCTCCCA CACAAAGTAT CTGAAACGGG GTCTGGTGAG	240
GGTGGGATTG TCGCATAAGG CCAGTGTTC GAGGAAGGCC TTGAGCTTCT TCTTGGACAC	300
TGTCTTAGAA AGCGTTTG C TCTGGGGCCA CCAGTCTCAT GCGAGACTGT GTGCCTTGGC	360
CAGTACGGAT GTGGTCCCTG GGAAGGCAGC GTGTCGAGGC GAGTGTGGGC CACAACATCC	420
TCGCCTGAGG GACTGGGGAC CCTCTTGGGT TTGGAGCAGG CCAAGGAATC CTTCTTAGGA	480

GAGTGGGCC CGTTTCCTTC TCCTGGTCAG AACCCAAAAA GGAGCTCAGC GGCGGCCACT 540
GGGG 544

請求の範囲

1. hINOS遺伝子の3'-フランкиング領域の少なくとも一部分を含むDNA。
2. hINOS遺伝子の3'-フランкиング領域が配列番号16の塩基配列からなる、

請求項1記載のDNA。

3. 1) 請求項1または2記載のDNA、及び2) hINOS遺伝子の3'-UTRの少なくとも一部、を含む発現制御配列。
4. 請求項3記載の発現制御配列を含む、発現ベクター。
5. レポーター遺伝子を更に含む、請求項4記載の発現ベクター。
6. プロモーターを含むhINOS遺伝子の5'-フランкиング領域、レポーター遺伝子、請求項3記載の発現制御配列を、5'側からこの順序で含む、発現ベクター。
7. 請求項5または6記載の発現ベクターで形質転換された細胞。
8. 請求項3記載の発現制御配列を有する細胞を被験物質で処理し、レポーター遺伝子の発現量の変化を観察することを特徴とする、hINOS遺伝子の発現量に影響を与える物質のスクリーニング方法。
9. 発現制御配列を有する細胞が請求項7記載の細胞である、請求項8記載のスクリーニング方法。
10. 被験物質が混合物であることを特徴とする、請求項8記載のスクリーニング方法。
11. 請求項7記載の細胞を含む、hINOS遺伝子の発現量に影響を与える物質をスクリーニングするためのキット。
12. 請求項3記載の発現制御配列を有する細胞を、hINOS遺伝子の発現量に影響を与える特定の物質と被験物質とで処理し、レポーター遺伝子の発現量の変化を観察することを特徴とする、該hINOS遺伝子の発現量に影響を与える特定の物質の活性を変化させる物質のスクリーニング方法。
13. 発現制御配列を有する細胞が請求項7記載の細胞である、請求項12記

載のスクリーニング方法。

14. 被験物質が混合物であることを特徴とする、請求項12記載のスクリーニング方法。

15. 請求項7記載の細胞を含む、*hINOS*遺伝子の発現量に影響を与える特定の物質の活性を変化させる物質のスクリーニングするためのキット。

16. 請求項8乃至10のいずれかに記載のスクリーニング方法を用いて得ることができる、*hINOS*遺伝子の発現量に影響を与える化合物。

17. *hINOS*遺伝子の発現を抑制する、請求項16記載の化合物。

18. 請求項16記載の化合物を有効成分として含有する、*hINOS*遺伝子の発現の異常を伴う疾患を治療するための医薬組成物。

19. *hINOS*遺伝子の発現の異常を伴う疾患を治療するための医薬組成物の調製のための請求項16記載の化合物の使用。

20. 請求項16記載の化合物を投与することを含む、*hINOS*遺伝子の発現の異常を伴う疾患を治療又は予防する方法。

21. 請求項17記載の化合物を有効成分として含有する、*hINOS*遺伝子の発現過剰を伴う疾患を治療するための医薬組成物。

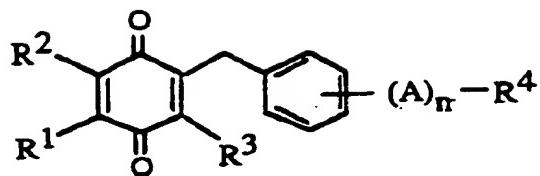
22. *hINOS*遺伝子の発現過剰を伴う疾患を治療するための医薬組成物の調製のための請求項17記載の化合物の使用。

23. 請求項17記載の化合物を投与することを含む、*hINOS*遺伝子の発現過剰を伴う疾患を治療又は予防する方法。

24. 請求項12乃至14のいずれかに記載のスクリーニング方法を用いて得ることができる、*hINOS*遺伝子の発現量に影響を与える特定の化合物の活性を変化させる化合物。

25. *hINOS*遺伝子の発現を誘導する化合物の活性を抑制する、請求項24記載の化合物。

26. 下記の化学構造式で示される、請求項25記載の化合物。



[式中R¹、R²およびR³はそれぞれ独立に水素原子、メチル基又はメトキシ基を表し、Aはエチレン基又はビニレン基を表し、nは0又は1を表し、R⁴は水素原子、ヒドロキシメチル基、エステル化又はアミド化されていてもよいカルボキシル基を表す。]

27. 請求項24記載の化合物を有効成分として含有する、hNOS遺伝子の発現の異常を伴う疾患を治療するための医薬組成物。

28. hNOS遺伝子の発現の異常を伴う疾患を治療するための医薬組成物の調製のための請求項24記載の化合物の使用。

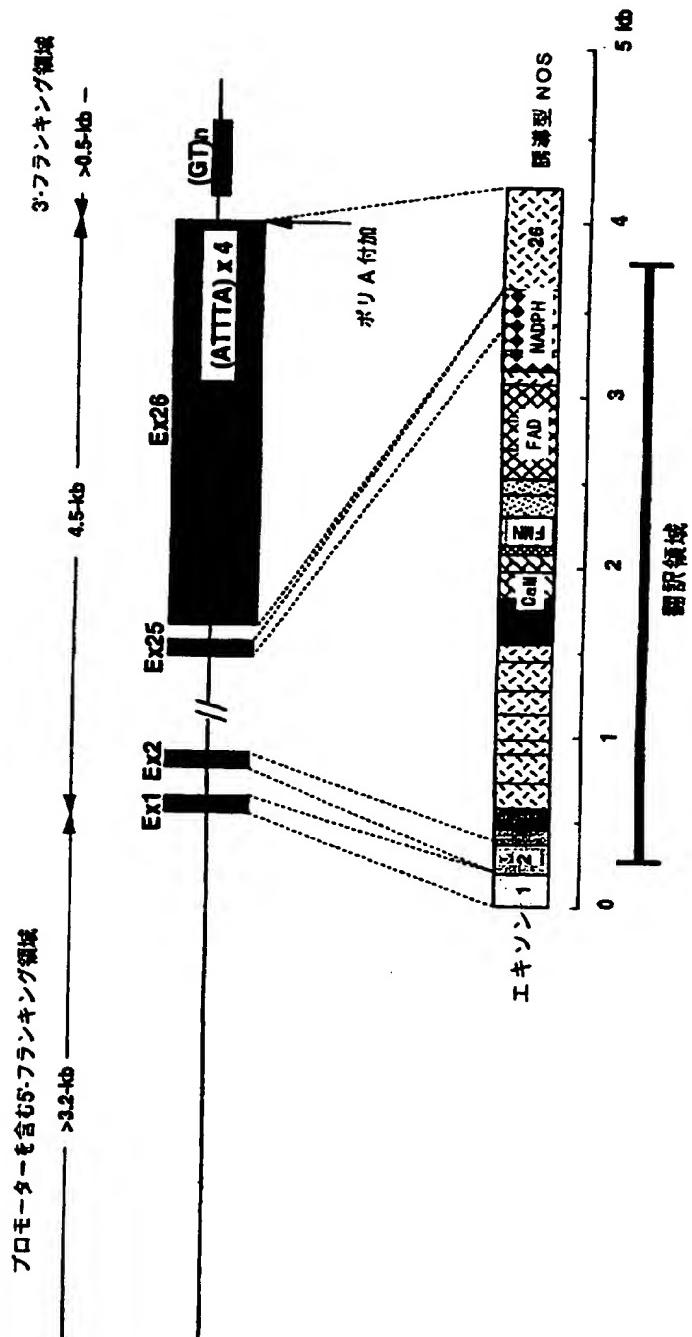
29. 請求項24記載の化合物を投与することを含む、hNOS遺伝子の発現の異常を伴う疾患を治療又は予防する方法。

30. 請求項25または26記載の化合物を有効成分として含有する、hNOS遺伝子の過剰発現を伴う疾患を治療するための医薬組成物。

31. hNOS遺伝子の過剰発現を伴う疾患を治療するための医薬組成物の調製のための請求項25または26記載の化合物の使用。

32. 請求項25または26記載の化合物を投与することを含む、hNOS遺伝子の過剰発現を伴う疾患を治療又は予防する方法。

1

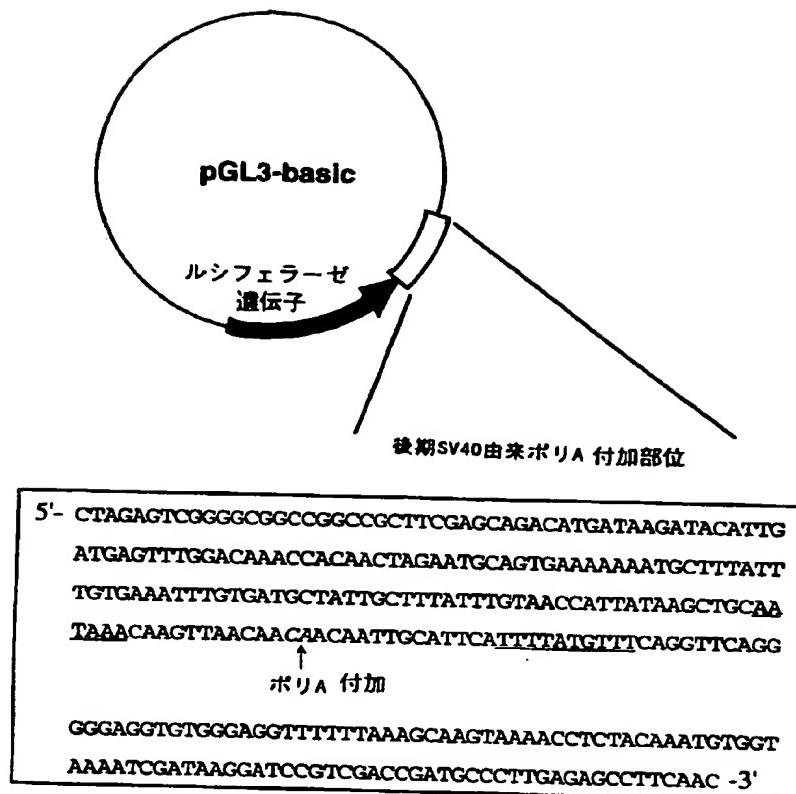


2 / 19

2

3 / 19

図 3



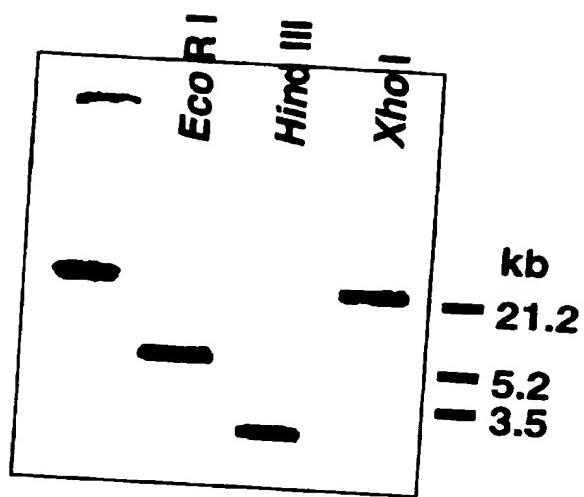
4 / 1 9

☒ 4

SU802 5'-CTTCTCAGCCACCTGGTGAGG-3'
MI103 5'-TTCTGTGCAGTCCCAGTGAGG-3'
SA101 5'-AGCCAGAACGCGTATCACCG-3'
KI101 5'-TGTGATTAAAGTAAAATGCAATTATG-3'
SA102 5'-GCCTGGAGATGTCAGCGCTCTG-3'
KI102 5'-GGGAACAGACTGGGTGTTAG-3'
KI103 5'-CATTAGGTGACACTATAG-3'
SA103 5'-GGCGCTAGCCTACAGGAGGGGTTAAAGCT-3'
KI104 5'-GCGGCCGCGTCGACGATTAAAGTAAAATGCAATTATG-3'
KI105 5'-GCGCGGATCCGGCCCCACTCTCCTAAG-3'

5 / 1 9

図 5



6 / 1 9

図 6

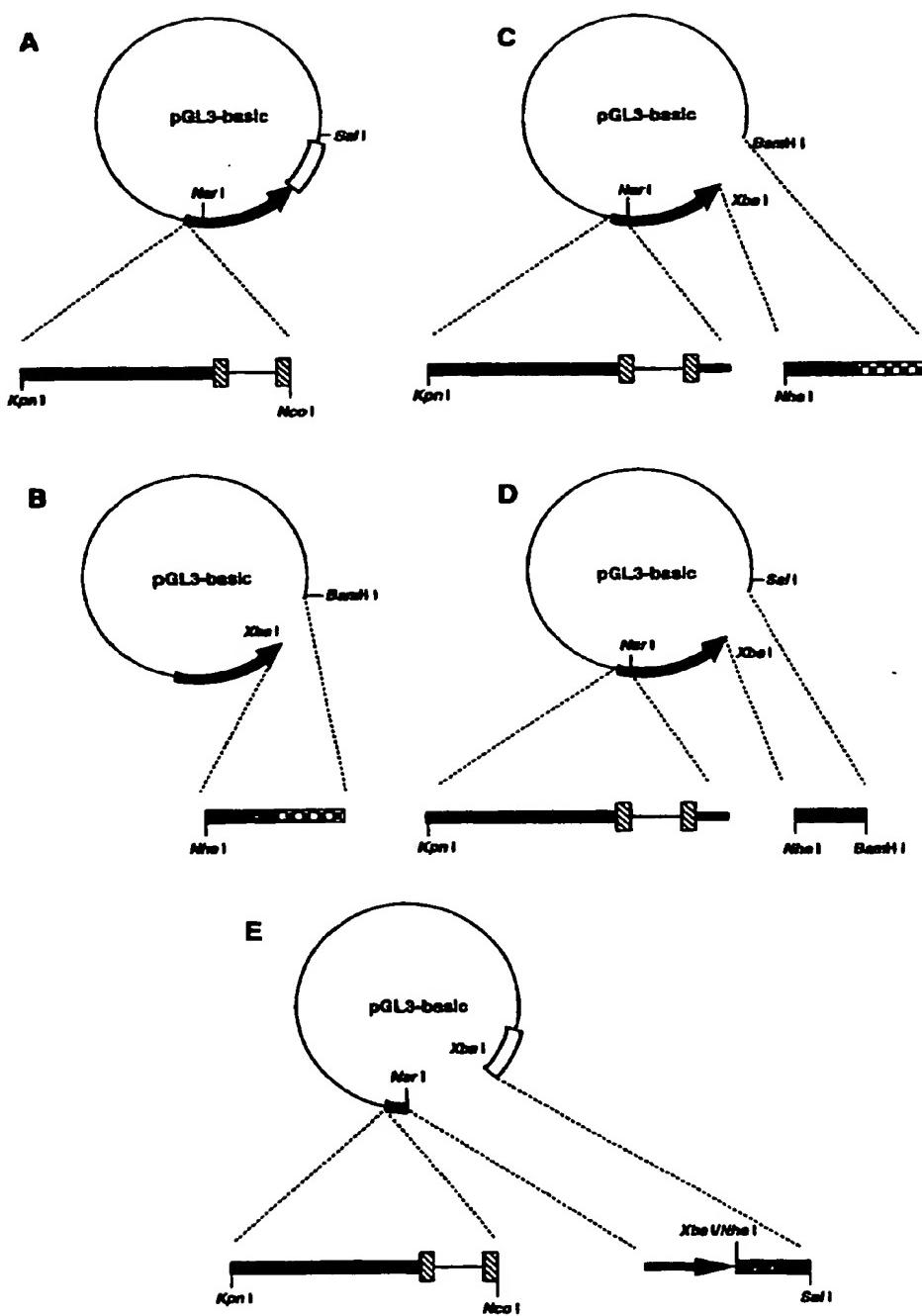
野生型の *hNOS cDNA 配列* 5' -ATGGCCTGTCCTTGGAAATTCTGTT-3'
変異体配列 5' -ATGGCCTGTCCCATGGAAATTCTGTT-3'

7 / 19

7

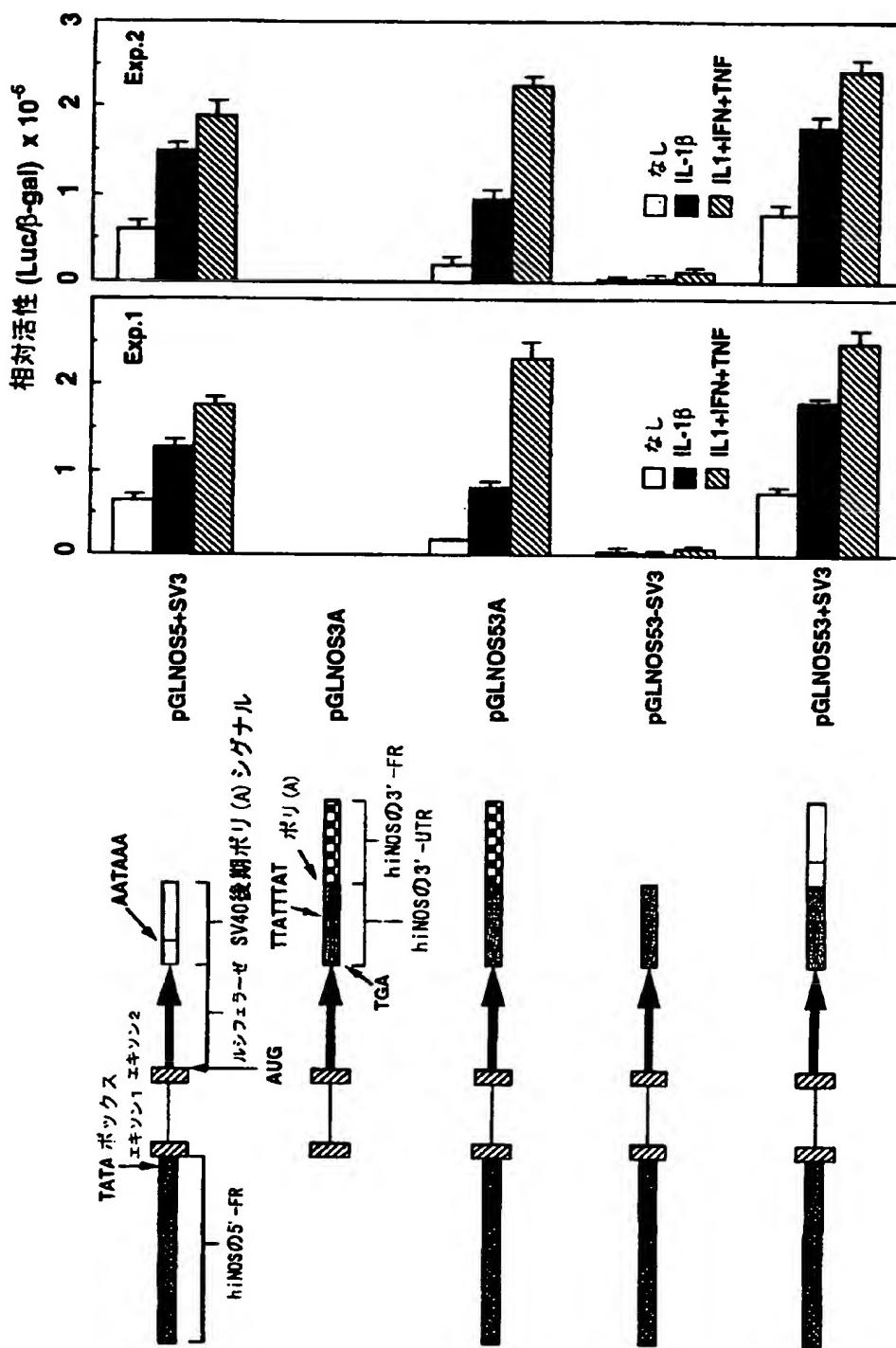
8 / 19

図 8



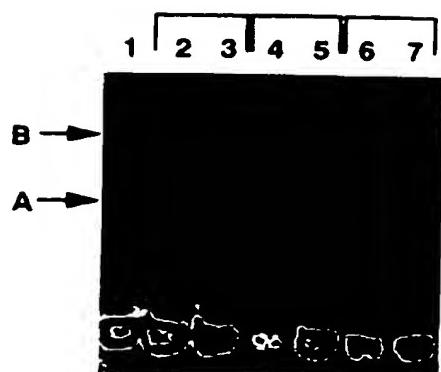
9 / 19

図9



10 / 19

図 10



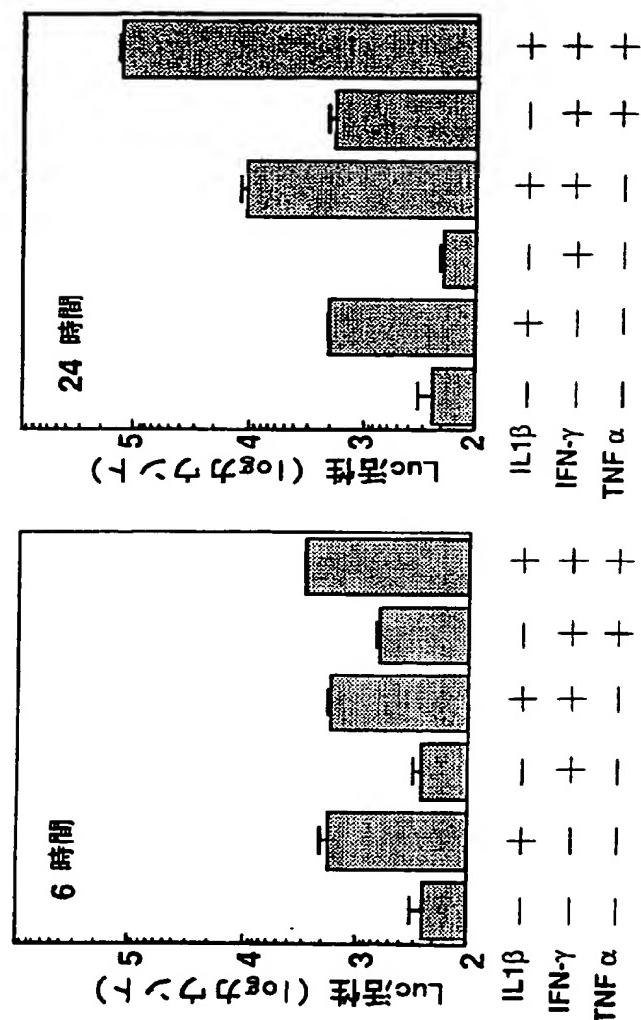
A549 細胞をサイトカイン刺激したときの
核抽出物のゲルシフトアッセイ

- 1 ; 抽出物無し
- 2, 3 ; サイトカイン刺激無し
- 4, 5 ; IL-1 β 3時間刺激
- 6, 7 ; CM 3時間刺激

3, 5, 7 は 20 倍濃度の DIG-フリー プローブを添加した

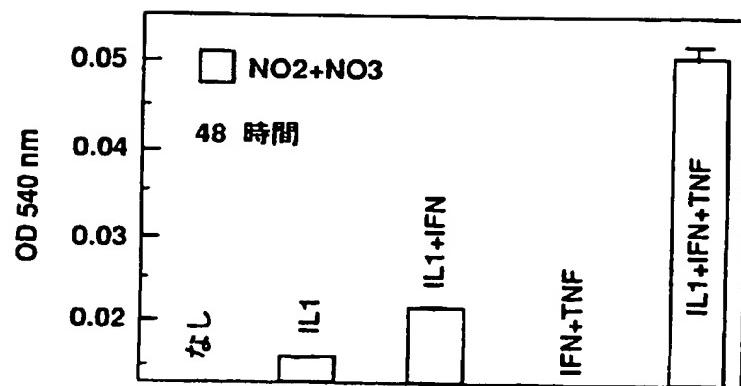
11 / 19

図 1 1



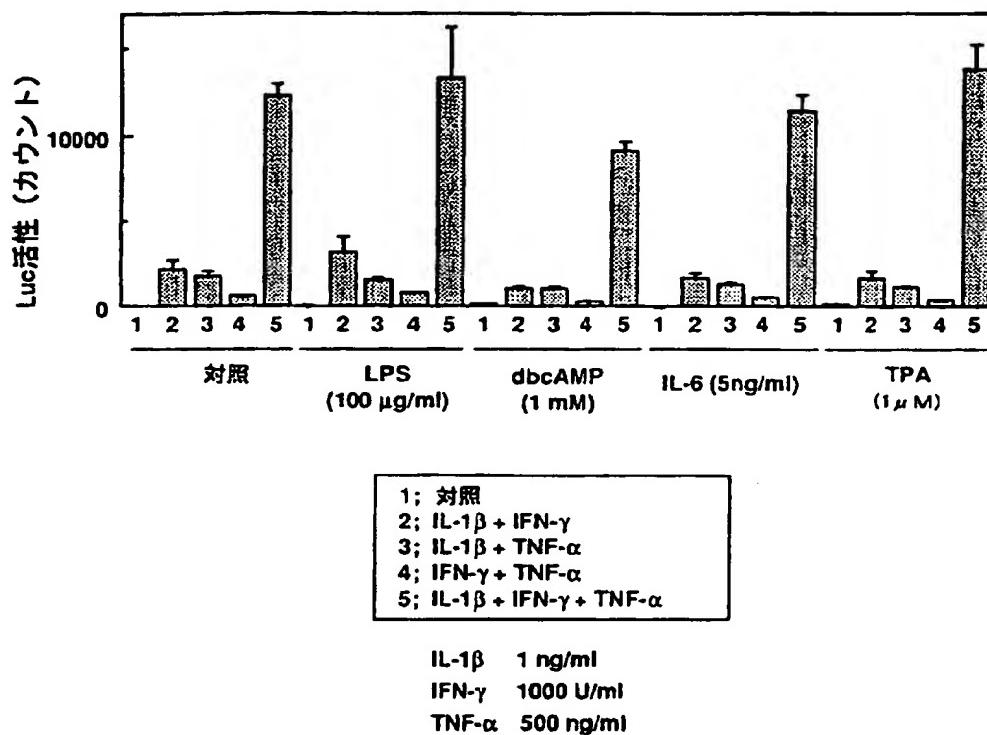
12 / 19

図 12



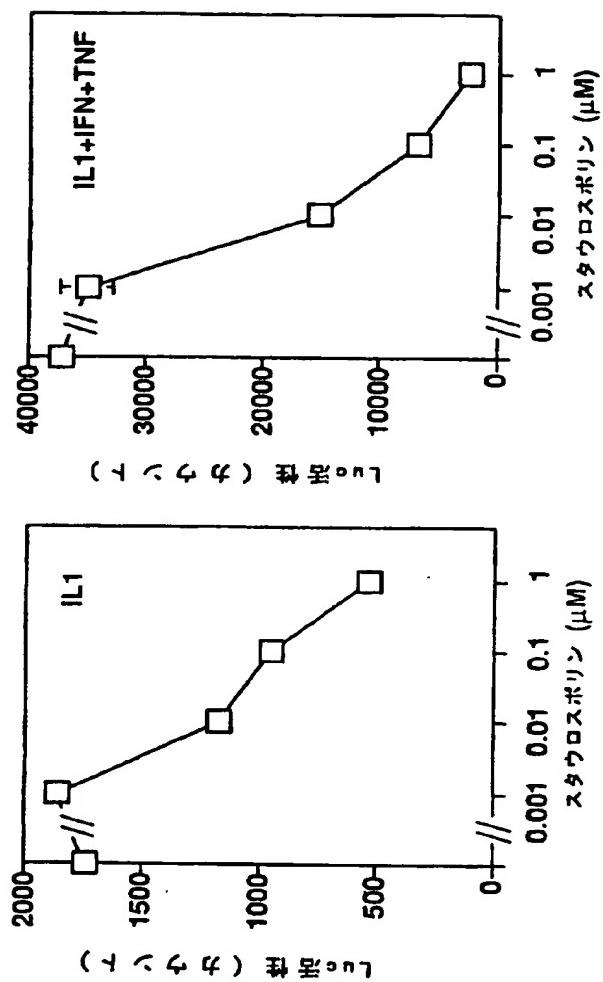
13 / 19

図 13



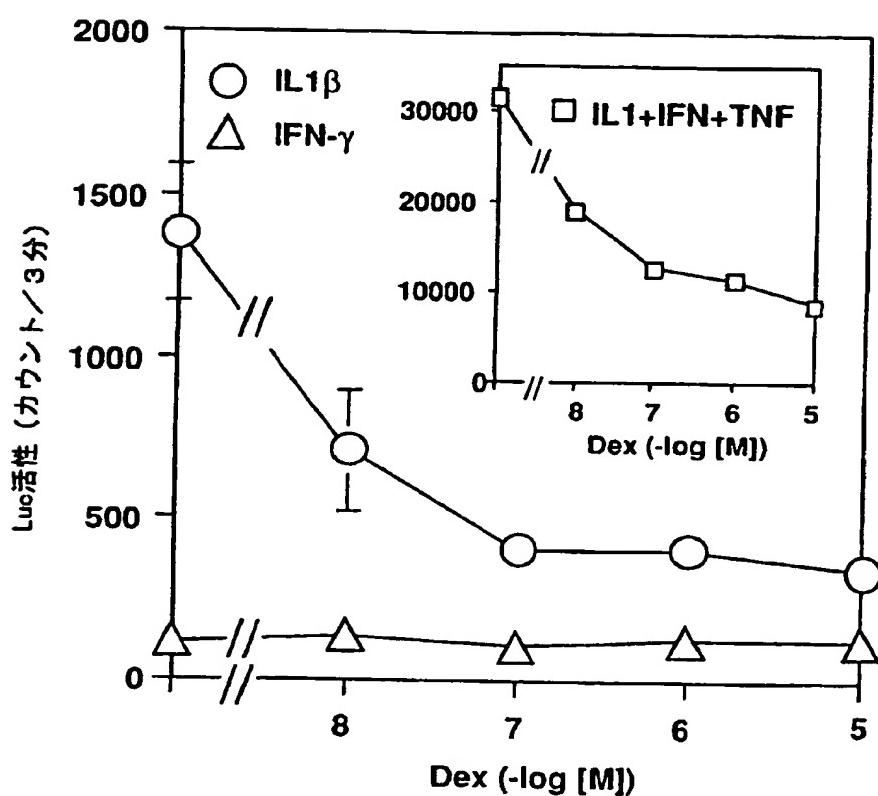
14 / 19

図 14



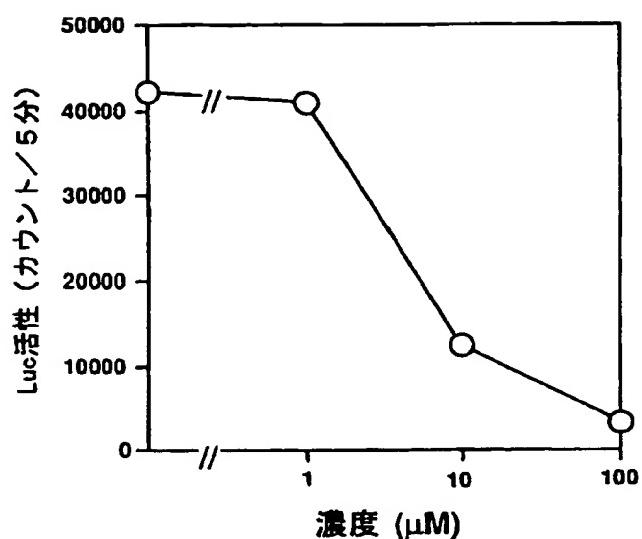
15 / 19

図 15



16 / 19

図16

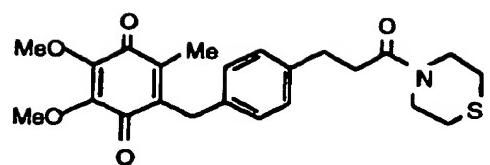


WO 98/12313

PCT/JP97/03303

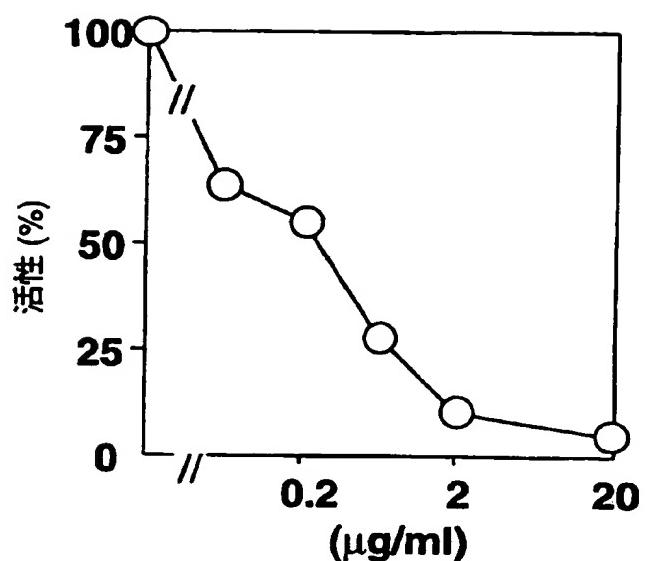
17 / 19

图 17



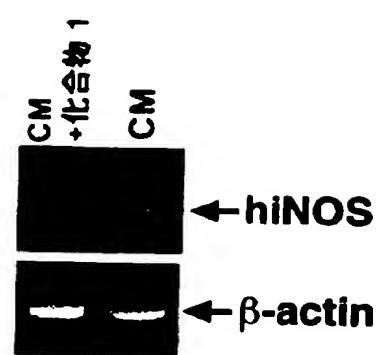
18 / 19

図 18



19 / 19

図 19



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03303

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl⁶ C12N15/09, C12N15/11, C12Q1/02, C12Q1/25, G01N33/53, C07C50/06, C07C50/30, C07C66/00, C07D295/16, A61K31/12, A61K31/165, A61K31/215
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. Cl⁶ C12N15/09, C12N15/11, C12Q1/02, C12Q1/25, G01N33/53, C07C50/06, C07C50/30, C07C66/00, C07D295/16, A61K31/12, A61K31/165, A61K31/215

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), CA (STN), GenBank/EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MICHAEL E. DE VERA et al., "Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: Initial analysis of the human NOS2 promoter", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93 (Feb. 1996) p. 1054-1059	1-19, 21, 22, 24-28, 30, 31
A	NUNOKAWA Y. et al., "PROMOTER ANALYSIS OF HUMAN INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE GENE ASSOCIATED WITH CARDIOVASCULAR HOMEOSTASIS", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Vol. 200, No. 2 (Apr. 29, 1994) p. 802-807	1-19, 21, 22, 24-28, 30, 31

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier documents but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search December 12, 1997 (12. 12. 97)	Date of mailing of the international search report December 24, 1997 (24. 12. 97)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03303

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 20, 23, 29, 32
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 20, 23, 29 and 32 pertain to methods for treatment of the human or animal body by therapy.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP97/03303

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl' C12N 15/09, C12N 15/11, C12Q 1/02, C12Q 1/25,
 G01N 33/53, C07C 50/06, C07C 50/30, C07C 66/00,
 C07D 295/16, A61K 31/12, A61K 31/165, A61K 31/215

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl' C12N 15/09, C12N 15/11, C12Q 1/02, C12Q 1/25,
 G01N 33/53, C07C 50/06, C07C 50/30, C07C 66/00,
 C07D 295/16, A61K 31/12, A61K 31/165, A61K 31/215

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), CA (STN), GenBank/EMBL

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	MICHAEL E. DE VERA et al., "Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: Initial analysis of the human NOS 2 promoter", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93 (Feb. 1996) p. 1054-1059	1-19, 21, 22, 24-28 30, 31
A	NUNOKAWA Y. et al., "PROMOTER ANALYSIS OF HUMAN INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE GENE ASSOCIATED WITH CARDIOVASCULAR HOMEOSTASIS", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Vol. 200, No. 2 (Apr. 29, 1994) p. 802-807	1-19, 21, 22, 24-28 30, 31

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 12.12.97	国際調査報告の発送日 24.12.97
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 竹内 亜希 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3449

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP97/03303

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの1の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 20, 23, 29, 32 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲20、23、29及び32は、人又は動物の治療による処置方法の発明に該当する。

2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの2の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。